

## Phosphinat-Peptidanaloga zur Behandlung von fibrotischen Erkrankungen

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Phosphinat-Peptidanaloga als Inhibitoren  
5 der Procollagen-C-Proteinase (PCP) zur Behandlung fibrotischer Erkrankungen.

Es ist bekannt, daß die Procollagen-C-Proteinase (PCP) ein Schlüsselenzym der Fibrogenese ist. Sie katalysiert die hydrolytische Abspaltung der Procollagenpropeptide von den Procollagenen I, II, III und IV sowie Laminin V [vgl. Amano S,

10 Takahara K; Gerecke D, Nishiyama T, Lee S, Greenspan DS, Burgeson RE: Bone morphogenetic protein-1 is the processing enzyme for laminin 5 in human keratinocytes, Mol. Biol. Cell 7 (suppl.) 58A (1996)]. Somit ist die PCP ein Schlüsselenzym der Collagenprozessierung [vgl. Olsen BJ: Morphogenesis: collagen it takes and bone it makes, Curr. Biol. 6: 645-647 (1996)]. In BMP-I-knock-out-  
15 Mäusen wurde nachgewiesen, daß eine komplette Abwesenheit der PCP zu einer unvollständigen Collagenprozessierung mit der Ablagerung von atypischen, lockeren Collagenfibrillen führt [vgl. Suzuki N, Labosky PA, Furata Y, Hargett I, Dunn R, Fogo AB, Takahara K, Peters DM, Greenspan DS, Hogan BL: Failure of ventral body wall closure in mouse embryos lacking a procollagen C-proteinase encoded by  
20 BMP-1, a mammalian gene related to Drosophila tolloid, Development 122: 3587-3595 (1996)].

Die PCP ist wahrscheinlich auch für die hydrolytische Abspaltung der Propeptidsequenz der Lysyloxidase verantwortlich. Wahrscheinlich führt die Abspaltung der Prosequenz zur Aktivierung der katalytischen Lysyloxidaseaktivität der maturen Form [vgl. Pachenko MV, Stetler-Stevenson WG, Trubetskoy OV, Gacheru SN, Kagan HM: Metalloproteinase activity secreted by fibrogenic cells in the processing of prolysyl oxidase. Potential role of procollagen C-proteinase, J. Biol. Chem. 271: 7113-7119 (1996)]. Aktive Lysyloxidase verknüpft gegenüberliegende Collagenfibrillen kovalent miteinander. Auf diese Weise wird die biologische Stabilität des  
25  
30

Collagens gegenüber dem Abbau durch Collagenasen indirekt auch durch die PCP erhöht.

Die PCP oder eng verwandte Proteine scheinen auch bei der Freisetzung von TGF $\beta$ -artigen Wachstumsfaktoren eine Rolle zu spielen. Durch neue Arbeiten konnte gezeigt werden, daß PCP-ähnliche Proteasen TGF $\beta$ -artige Wachstumsfaktoren aus einem inaktiven Komplex mit TGF $\beta$ -Bindungsproteinen herauslösen können [vgl. Marques G, Musacchio M, Shimell MJ, Wünnenberg-Stapleton K, Cho KWY, O'Connor MB: Production of a DPP activity gradient in the early drosophila embryo through the opposing actions of the SOG and TLD proteins, Cell 91: 417-426 (1997); Blader P, Rastegar S, Fischer N, Strähle U: Cleavage of the BMP antagonist chordin by zebrafish tolloid, Science 278: 1937-1940 (1997)]. Dabei wird der Bindungspartner der TGF $\beta$ -artigen Wachstumsfaktoren durch spezifische Proteolyse zersetzt. Indirekt besitzt die PCP also möglicherweise auch eine TGF $\beta$ -agonistische Aktivität. Daher kann der PCP eine entscheidende Rolle in der Fibrogenese zugesprochen werden.

Die PCP-Aktivität geht auf Splicevarianten des BMP-I-Gens zurück [vgl. Kessler E, Takahara K, Biniaminow L, Brusel M, Greenspan DS: Bone morphogenetic protein-1: The type I procollagen C-proteinase, Science 271: 360-362 (1996); Reddi AH: BMP-1: Resurrection as procollagen C-proteinase. Science 217: 463 (1996); Li SW, Sieron AL, Fertala A, Hojima Y, Arnold WV, Prockop DJ: The C-proteinase that processes procollagens to fibrillar collagens is identical to the protein previously identified as bone-morphogenetic protein-1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 5127-5130 (1996)]. Bislang ist gesichert, daß die Splicevarianten BMP I-I und BMP I-III (tld-Variante) Procollagen und Pro-Lysyloxidase spezifisch schneiden können. Durch neuere Arbeiten wurden weitere BMP-1-Splicevarianten identifiziert, deren biologische Funktion und Substratspezifität aber zum Teil noch ungeklärt ist [vgl. Janitz M, Heiser V, Böttcher U, Landt O, Lauster R: Three alternatively spliced variants of the gene coding for the human bone morphogenetic protein-1. J. Mol. Med. 76: 141-146 (1998)].

Obwohl die Expressionsclonierung und Aufreinigung der PCP bisher nur in kleinen Ausbeuten gelungen ist, sind von dem Enzym zahlreiche strukturelle Details bekannt. Die PCP gehört nämlich zur Familie der Astacinproteasen. Die Kristallstruktur des Astacins ist im Detail bekannt. Zwischen der katalytischen Domäne von BMP-I und 5 Astacin gibt es einen sehr hohen Grad an struktureller Homologie, so daß es möglich war, vielen Aminosäuren der PCP-Proteasedomäne aufgrund dieser Homologie die wahrscheinliche strukturelle und biochemische Funktion zuzuordnen [vgl. Stöcker W, Gomis-Rüth FX, Bode W, Zwilling R: Implications of the three-dimensional structure of astacin for the structure and function of the astacin family of zinc-endopeptidases, Eur. J. Biochem. 214: 215-231 (1993)].

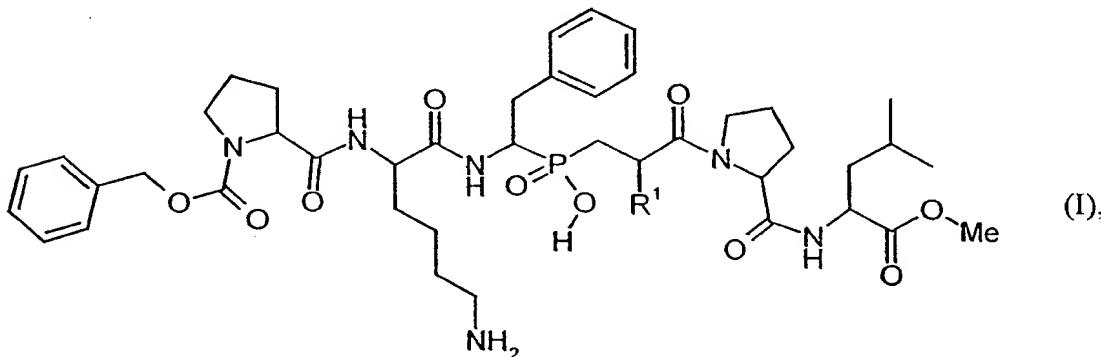
10 Durch computergesteuertes "Molecular Modelling" konnte in der Vergangenheit die Substratbindung an das aktive Zentrum der Astacine im molekularen Detail hergeleitet werden [vgl. Stöcker W, Grams F, Baumann U, Reinemer P, Gomis-Rüth 15 FX, McKay DB, Bode W: The metzincins – Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-endopeptidases, Prot. Sci.: 823-840 (1995)]. Diese Arbeiten führten zum "rational design" von Phosphinat-Peptidanalogia, die das Astacin mit hoher Wirkpotenz inhibieren. Der Komplex zwischen einem Phosphinatininhibitor und 20 Astacin wurde strukturell aufgeklärt [vgl. Grams F, Dive V, Yiotakis A, Yiallouros I, Vassilou S, Zwilling R, Bode W, Stöcker W: Structure of astacin with transition-state analogue inhibitor, Nature Struct. Biol. 3: 671-675 (1996)].

25 Bisher wurde trotz der hohen strukturellen Homologie zwischen Astacin und der katalytischen Domäne von BMP-1 davon ausgegangen, daß die beiden Proteasen sich aufgrund biochemischer Unterschiede hinsichtlich ihres Reaktionsverhaltens auch in der Hemmbarkeit durch Proteaseinhibitoren deutlich unterscheiden. Biochemische Unterschiede zwischen Astacin und BMP-I bestehen z.B. hinsichtlich der Substratspezifität (Astacin hydrolysiert als Verdauungsenzym des Flußkrebses relativ unspezifisch kollagenartige Proteine, während die PCP hochspezifisch an nur einer Stelle 30 im Procollagenmolekül und in der Pro-Lysyloxidase schneidet).

In der Literatur sind bisher nur niederpotente Inhibitoren der PCP beschrieben, denen eine antifibrotische Wirkung zugeschrieben wird [vgl. Brenner M, Ho WB: C-proteinase inhibitors for the treatment of disorders related to the overproduction of collagen. WO 97/05865]

5

Überraschenderweise wurde jetzt gefunden, daß Phosphinatpeptidanaloge der allgemeinen Formel (I),



10 in welcher

R<sup>1</sup> für Wasserstoff oder Methyl steht,

15 und deren Salze und Isomere die PCP mit sehr hoher Wirkpotenz inhibieren und deshalb zur Behandlung und Prophylaxe von fibrotischen Erkrankungen verwendet werden können.

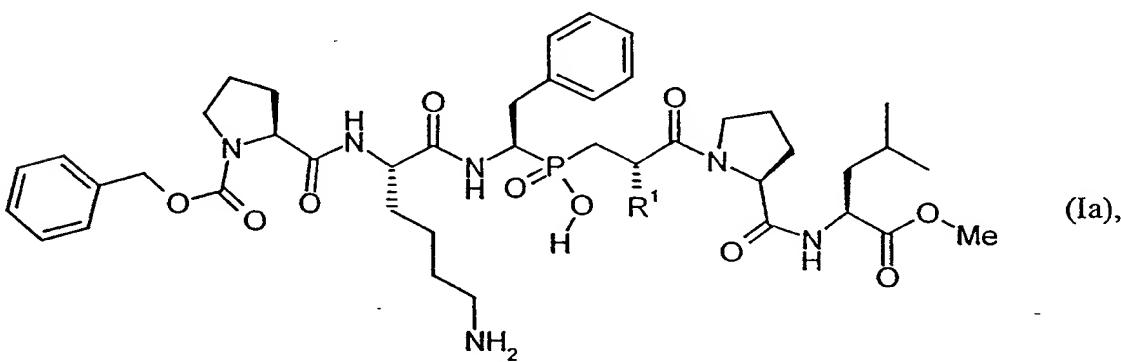
20 Im Rahmen der Erfindung sind physiologisch unbedenkliche Salze bevorzugt. Physiologisch unbedenkliche Salze sind im allgemeinen Salze der erfundungsgemäßen Verbindungen mit anorganischen oder organischen Säuren. Bevorzugt werden Salze mit anorganischen Säuren, wie Salzsäure, Bromwasserstoffsäure, Phosphorsäure oder Schwefelsäure oder Salze mit organischen Carbon- oder Sulfonsäuren, wie Essigsäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure, Zitronensäure, Weinsäure, Milchsäure, Benzoe-

säure, oder Methansulfonsäure, Ethansulfonsäure, Phenylsulfonsäure, Toluolsulfonsäure oder Naphthalindisulfonsäure.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können in stereoisomeren Formen existieren,  
5 die sich entweder wie Bild und Spiegelbild (Enantiomere), oder die sich nicht wie Bild und Spiegelbild (Diastereomere) verhalten. Die Erfindung betrifft sowohl die Antipoden als auch die Racemformen sowie die Diastereomerengemische.

Die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) können in allen enantiomeren und  
10 diastereomeren Formen vorliegen. Bevorzugt sind diejenigen Isomeren, in denen die aus Prolin, Lysin und Leucin gebildeten Molekülteile die L-Konfiguration besitzen, ebenso wie deren Salze und Prodrugs.

Besonders bevorzugt werden Phosphinatpeptidanaloge der allgemeinen Formel (I)  
15 mit aufgezeigter Konfiguration

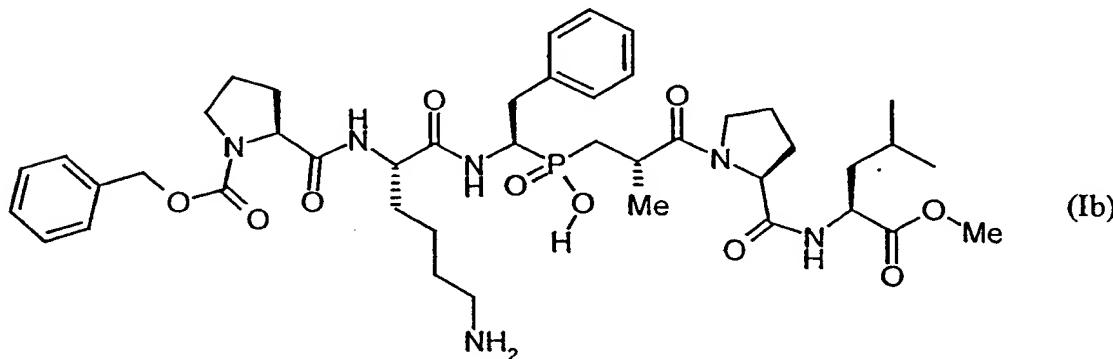


in welcher

20 R<sup>1</sup> für Wasserstoff oder Methyl steht,

und deren Salze und Isomere zur Behandlung und Prophylaxe von fibrotischen Erkrankungen verwendet.

Ganz besonders bevorzugt wird die Verbindung der allgemeinen Formel (Ib)



im folgenden als Z---PKF(PC)APL---O-Me bezeichnet,

5

deren Enantiomere und deren Salze zur Behandlung und Prophylaxe von fibrotischen Erkrankungen verwendet.

Die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) sind bekannt und können grundsätzlich nach üblichen Methoden der Peptidsynthese aus entsprechenden Phosphinatverbindungen hergestellt werden [vgl. hierzu Yiotakis A, Vassilio S, Jiracek J, Dive V: Protection of the Hydroxyphosphinyl Function of Phosphinic Dipeptides by Adamantyl. Application to the Solid-Phase Synthesis of Phosphinic Peptides, J. Org. Chem. 61: 6601-6605 (1996); Campagne JM, Coste J, Guillou L, Heitz A, Jouin P: Solid phase synthesis of phosphinic peptides, Tetrahedron Lett. 34: 4181-4184 (1993)].

Die Ergebnisse waren unerwartet, weil sich BMP-I, Meprin und Astacin vor allem im sogenannten SI'-Loop unterscheiden. Ein Ausschnitt aus diesem Loop ist hier dargestellt:

Astacin:	T--DPYD
BMP-I:	KPIIG-Q
Meprin:	I -- IG-Q

Dieser Loop bildet den essentiellen Teil der S1'-Bindungstasche der Astacin-ähnlichen Proteasen. Hier liegt, wie am Beispiel des Astacins und des Meprins gezeigt wurde, der Schlüssel zur unterschiedlichen Substrat- und Inhibitorspezifität beider Enzyme. In der S1'-Tasche unterscheiden sich Meprin und Astacin sehr deutlich. Die 5 PCP hat zusätzlich zwei Prolinreste und einen Lysinrest in dieser Region. Wie durch Computermodelling der Proteasedomäne der PCP gezeigt werden konnte, ist der Lysinrest sehr wahrscheinlich an der Bindung der Carboxylgruppe in der Seitenkette des Aspartats in P1' neben der Spaltstelle im Procollagen beteiligt. Die Prolinreste liegen nach dem Modell in der *cis*-Konfiguration vor und sind eine Eigentümlichkeit 10 der BMP-I-Subfamilie unter den Astacinen. Im Gegensatz dazu spaltet Astacin nicht neben sauren Resten. Aus diesen Gründen war es völlig unerwartet, daß sich ein für die Inhibition von Astacin entworfenes Phosphinat [vgl. Yiallouros I, Vassiliou S, Yiotakis A, Zwilling R, Stöcker W, Dive V: Phosphinic peptides, the first potent inhibitors of astacin, behave as extremely slow-binding inhibitors, Biochem. J. 331: 15 375-379 (1998)] als effektiver PCP-Hemmstoff erwies.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel (I) zeigen ein nicht vorhersehbares, wertvolles pharmakologisches Wirkspektrum.

20 Überraschenderweise zeichnen sich die erfindungsgemäßen Verbindungen durch eine sehr hohe Wirkpotenz bei der Inhibition der PCP aus.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind deshalb zur Behandlung von Leberfibrosen jeder Genese und von Fibrosen mit anderer Organmanifestation geeignet.

25 Dazu gehören diverse Gruppen von Krankheiten, die mit einer qualitativ veränderten Collagenproduktion oder mit einer verstärkten Ablagerung von Collagen im Extracellularraum einhergehen, wie Leberfibrosen unterschiedlichen Ursprungs, wie z.B. alkoholische Leberzirrhose, biliäre Zirrhose, Hepatitiden viraler oder anderer Genese, 30 idiopathische interstitielle Fibrosen, idiopathische Lungenfibrosen, akute pulmonale Fibrosen, das "acute respiratory distress syndrome" (ARDS), perimuskuläre Fibro-

sen, perizentrale Fibrosen, Dermatofibrome, Nierenfibrosen, die diabetische Nephropathie, Glomerulonephritiden, die systemische oder lokale Sklerodermie, Keloide, die hypertrophe Narbenbildung, Gelenkadhäsionen, Arthrosen, Myelofibrosen, Vernarbungen der Cornea, die cystische Fibrose, muskuläre Fibrosen, die 5 Duchenne'sche Muskeldystrophie, Ösophagusstrukturen, Morbus Ormond, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und Aneurysmen der großen Gefäße.

Außerdem umfaßt die Erfindung fibrotische Erkrankungen, die initiiert oder hervorgerufen werden durch chirurgische Narbenrevisionen, plastische Chirurgie, Glaukom, Kataraktfibrosen, Vernarbungen der Cornea, die sogenannte "graft versus host disease", chirurgische Eingriffe an Sehnen, Nerveneinklemmungssyndrome, die Dupuytren'sche Kontraktur, Adhäsionen infolge gynäkologischer Eingriffe, pelvische Adhäsionen, peridurale Fibrosen, Erkrankungen der Schilddrüse oder der Nebenschilddrüsen, durch metastatischen Knochenbefall, durch das multiple Myelom 10 oder durch Restenosen.

#### Nachweis der PCP-Aktivität im Fluoreszenzdequenchtest

Zum Nachweis der PCP-Aktivität wurde ein synthetisches Dekapeptidsubstrat mit 20 der Sequenz

DABCYI - Asp - Phe - Tyr - Arg - Ala - Asp - Gln - Pro - Arg - Asp (EDANS) - NH<sub>2</sub>

durch Zusatz von PCP gespalten. Diese Peptidfrequenz entspricht der Region im 25 Procollagen  $\alpha_2$  (I), die von PCP gespalten wird. Die Spaltsequenz ist biochemischen Experten bekannt [vgl. Lee ST, Kessler E, Greenspan DS: Analysis of site-directed mutations in human pro- $\alpha_2$ (I) collagen which block cleavage by the C-proteinase, J. Biol. Chem. 265: 21992-21996 (1990)], ebenso das Verfahren des Dequenchtests 30 [vgl. Matayoshi ED, Wang GT, Krafft GA, Erickson J: Novel fluorogenic substrates

for assaying retroviral proteases by resonance energy transfer, Science 247: 954-958 (1989)].

Die Konzentration des synthetischen Peptids war 5.6 µM, die finalen Pufferbedingungen waren: 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl und 0,005 % Brj35.

Die Durchführung des kinetischen Test erfolgte wie im folgenden beschrieben: Das Fluoreszenzsubstrat wurde in 90 µl Reaktionspuffer gelöst. Die Kinetik des Substratumsatzes durch PCP wurde in Doppelbestimmungen durch Fluoreszenzmessung (Ex. 10 355 nm/Em. 538 nm) zwischen 0 bis 120 min detektiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer geeigneten Aktivität von PCP, in 10 µl Reaktionspuffer gelöst, gestartet. In Zeitintervallen von anfangs 5min und später in größeren Zeitintervallen wurde die Emission als ein Maß der proteolytischen Aktivität gemessen. Als Negativkontrolle wurde der spontane Zerfall des Fluoreszenzsubstrats bei Zugabe von 15 Reaktionspuffer ohne PCP-Aktivität gemessen. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten über einen Zeitraum von ca. 4h bei 37°C. Nach Ablauf der Reaktion wurde das Substrat durch Zugabe von Proteinase K (Boehringer Mannheim, 1,44 µg/Reaktionsansatz, gelöst in 10 µl PBS) und Inkubation bei 37°C für 20 min vollständig zersetzt. Die Vollständigkeit der Hydrolyse wurde dadurch gezeigt, daß keine 20 Zunahme der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit mehr erfolgte.

Der relative Substratumsatz in % der Gesamtmenge errechnete sich aus:

$$\% \text{ Umsatz} = (F_t - F_{-t}) / (F_{\text{total}} - F_{\text{ini}}) \times 100\%$$

25

wobei  $F_t$  die relative Fluoreszenz nach einem Zeitintervall  $t$  unter Inkubation mit PCP ist.  $F_{-t}$  ist die korrespondierende relative Fluoreszenz nach dem Zeitintervall  $t$  ohne PCP-Zusatz,  $F_{\text{total}}$  ist die Fluoreszenz nach Totalhydrolyse durch Zusatz von Proteinase K, und  $F_{\text{ini}}$  ist die initiale relative Fluoreszenz vor Start der Reaktion 30 durch Zugabe von Proteinase K.

In dem Test wurde die verwendete PCP-Aktivität typischerweise so eingestellt, daß mit inaktiviertem Enzym innerhalb des Meßzeitraumes ca. 20 % des Substrats umgesetzt wurden.

- 5 In Abbildung 1 ist eine typische Reaktionskinetik (% Umsatz) unter Zugabe des Phosphinatinhibitors Z---PKF(PC)APL---O-Me dargestellt.

Die prozentuale Inhibition unter Zugabe der Inhibitoren errechnete sich nach:

10  $\% \text{ Inhibition} = 100\% \times \% \text{ Umsatz (mit Inhibitor)} \div \% \text{ Umsatz (ohne Inhibitor)}$

In Abbildung 2 wird die Konzentrations-Wirkungsbeziehung eines Phosphinatinhibitors dargestellt.

15 Spezifitätsnachweis der PCP-Inhibitoren durch Untersuchung mit der Astacin-ähnlichen Protease Meprin in vitro

Meprin ist ein Enzym aus der Familie der Astacinproteasen, das im Menschen vorkommt (Stöcker W, Gomis-Rüth FX, Bode W, Zwilling R: Implications of the 20 three-dimensional structure of astacin for the structure and function of the astacin family of zinc-endopeptidases, Eur. J. Biochem. 214: 215-231 (1993)). Der Meprinaktivitätstest wurde komplett analog zum in vitro-Assay zur Messung der PCP-Aktivität durchgeführt. Anstatt der rekombinanten PCP wurde humanes Meprin verwendet, das das fluoreszenzmarkierte Dekapeptid ebenfalls umsetzt.

25

Abbildung 3 zeigt die Spezifität des hochwirksamen Phosphinat-Peptidanalogen Z---PKF(PC)APL---O-Me für PCP. Meprin wird auch bei Konzentrationen bis zu 100 nM (dosisabhängig) nur unwesentlich bei der Umsetzung des fluoreszenzmarkierten Peptids inhibiert.

30

Demonstration der biologischen Wirksamkeit

Die biologische Wirksamkeit der Substanzen kann in Zellkulturassays und *in vivo* demonstriert werden. Nach Applikation der Inhibitoren kann in humanen Zelllinien z.B. der Abfall der Konzentration an freiem Procollagen  $\alpha_1$  (III) Propeptid in den Überständen gemessen werden, weil dieses Peptid durch die Aktivität der PCP freigesetzt wird. Zur Messung der PIIICP-Konzentrationen im Überstand kann ein kürzlich etablierter Assay verwendet werden [vgl. Burchardt ER, Schröder W, Heke M, Kohlmeyer J, Neumann R, Kroll W: Expression cloning of C-terminal procollagen (III) propeptide and its use in a novel serum assay to monitor liver fibrogenesis, Hepatology 26: 487A (1997)].

Zum Nachweis des antifibrotischen Effekts der Substanzen in der Leber können z.B. das Tiermodell der akuten [vgl. Johnson SJ, Hines JE, Burt AD: Phenotypic modulation of perisinusoidal cells following acute liver injury: a quantitative analysis. Int. J. Exp. Path. 1992; 73: 765-772 (1992)] oder chronischen [vgl. McLean E, McLean A, Sutton P: Instant Cirrhosis. An improved method for producing cirrhosis of the liver in rats by simultaneous administration of carbon tetrachloride and phenobarbitone, Br. J. Exp. Pathol. 1969; 50: 502-506 (1969)] Tetrachlorkohlenstoff-induzierten Leberschädigung, das Modell der Leberfibrose durch Gallengangsligatur [vgl. Kountouras J, Billing B, Scheuer P: Prolonged bile obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat, Br. J. Exp. Pathol. 1984; 65: 305-311 (1984)] oder die durch heterologes Serum induzierte Leberfibrose [vgl. Bhunchet E, Wake K.: Suppression of experimental hepatic fibrosis by administration of vitamin A, Lab. Invest. 1985; 52: 182-194 (1985)] verwendet werden. Auch andere Tiermodelle, bei denen eine Leberfibrose auftritt, können zum Nachweis des antifibrotischen Effekts verwendet werden.

Je nach Organmanifestation oder Art der fibrotischen Schädigung können auch Tiermodelle für andere Fibrosemanifestationen, z.B. im Herzen, in den Nieren, in den Lungen, in der Haut oder anderen Organen verwendet werden.

Die Reduktion der Collagenablagerung kann z.B. durch die Bestimmung des Hydroxyprolingehalts [vgl. Gerling B, Becker M, Waldschmidt J, Rehmann M, Schuppan D.: Elevated serum aminoterminal procollagen type-III-peptide parallels collagen accumulation in rats with secondary biliary fibrosis, Hepatology 1996; 25: 5 79-84 (1996)] der fibrotischen Organe oder durch quantitative Morphometrie erfolgen [vgl. Kauschke SG, Knorr A, Olzen M, Burchardt ER: Expression of collagen (III) as determined by quantitative PCR and its correlation with extracellular collagen deposition in the rat CCl<sub>4</sub> model of liver fibrosis. Hepatology 26: 538A (1997)].

10

Abbildung 1 zeigt den Substratumsatz des DABCYL-EDANS-Dekapeptides durch rekombinante PCP in Abhängigkeit von der Zeit. Die Enzymaktivität wird in Anwesenheit von 100 nM Inhibitor fast vollständig inhibiert.

15

Abbildung 2 zeigt die Konzentrations-Wirkungsbeziehung des Phosphinatinhibitors Z---PKF(PC)APL---O-Me

20

Abbildung 3 zeigt die Spezifität des hochwirksamen Phosphinat-Peptidanalogen Z---PKF(PC)APL---O-Me für PCP. Meprin wird auch bei Konzentrationen bis zu 100 nM (dosisabhängig) nur unwesentlich bei der Umsetzung des fluoreszenzmarkierten Peptids inhibiert.

25

Zur vorliegenden Erfindung gehören auch pharmazeutische Zubereitungen, die neben inerten, nicht-toxischen, pharmazeutisch geeigneten Hilfs- und Trägerstoffen eine oder mehrere Verbindungen der allgemeinen Formel (I) enthalten, oder die aus einem oder mehreren Wirkstoffen der Formeln (I) bestehen, sowie Verfahren zur Herstellung dieser Zubereitungen.

30

Die Wirkstoffe der Formeln (I) sollen in diesen Zubereitungen in einer Konzentration von 0,1 bis 99,5 Gew.-%, bevorzugt von 0,5 bis 95 Gew.-% der Gesamtmasse vorhanden sein.

Neben den Wirkstoffen der Formeln (I) können die pharmazeutischen Zubereitungen auch andere pharmazeutische Wirkstoffe enthalten.

5 Die oben aufgeführten pharmazeutischen Zubereitungen können in üblicher Weise nach bekannten Methoden hergestellt werden, beispielsweise mit dem oder den Hilfs- oder Trägerstoffen.

10 Im allgemeinen hat es sich als vorteilhaft erwiesen, den oder die Wirkstoffe der Formeln (I) in Gesamtmengen von etwa 0,01 bis etwa 100 mg/kg, bevorzugt in Gesamtmengen von etwa 1 mg/kg bis 50 mg/kg Körpergewicht je 24 Stunden, gegebenenfalls in Form mehrerer Einzelgaben, zur Erzielung des gewünschten Ergebnisses zu verabreichen.

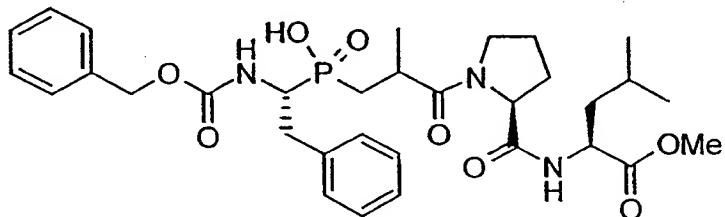
15 Es kann aber gegebenenfalls vorteilhaft sein, von den genannten Mengen abzuweichen, und zwar in Abhängigkeit von der Art und vom Körpergewicht des behandelten Individuums, vom individuellen Verhalten gegenüber dem Medikament, der Art und Schwere der Erkrankung, der Art der Zubereitung und Applikation, sowie dem Zeitpunkt bzw. Intervall, zu welchem die Verabreichung erfolgt.

20 Die Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel (I) wird nachstehend beispielhaft anhand einer exemplarischen Synthese der Verbindung der Formel (I, R= Methyl) gezeigt, auf welche die vorliegende Erfindung jedoch nicht beschränkt ist. Nachstehend beziehen sich alle Mengenangaben, soweit nicht anderweitig angegeben, auf Gewichtsprozente.

25

30

Bsp. 1a: (1*R*)-1-{[(Benzylxy)carbonyl]amino}-2-phenylethyl{3-[(2*S*)-2-  
({[(1*S*)-1-(methoxycarbonyl)-3-methylbutyl]amino}carbonyl)-  
tetrahydro-1*H*-pyrrol-1-yl]-2-methyl-3-oxopropyl}phosphinsäure



5

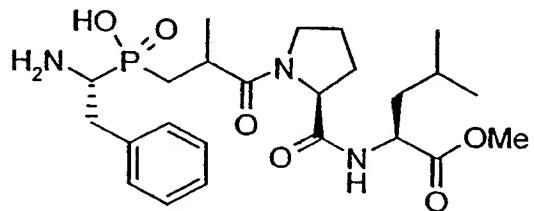
Zu einer Lösung von 1.4 bis 1.5 eq. [(1-Benzyloxycarbonyl)amino]-2-phenylethyl)-(2-carboxy-1-propyl)hydroxyphosphonsäure (hergestellt analog WO 89/10961, S. 72, Bsp.[14]) in absolutem Dichlormethan (ca. 0.1 bis 0.15 mol/l) werden nacheinander unter Argon bei 0°C 4.0 eq. Ethyldiisopropylamin, 1.50 eq. Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphoniumhexafluorophosphat (PyBop) (J. Martinez et al., J. Med. Chem. 1988, 28, 1874; J. Costre, D. Le-Nguyen, B. Castro, Tetrahedron Lett., 1990, 31, 2055) und nach 2 bis 5 min 1.0 eq. Pro-Leu-OMe-Trifluoressigsäuresalz (hergestellt nach Standardverfahren der Peptidchemie, vgl. z.B. Houben-Weyl, 4. Aufl.: Methoden der Organischen Chemie, Band XVI/-2, Synthese von Peptiden Teil 1 und Teil 2, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974) hinzugefügt. Nach 15-30 min wird die Eiskühlung entfernt und die Mischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wird mit Dichlormethan verdünnt und nacheinander mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung, 1N Salzsäure-Lösung und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt.

Ausbeute: 133.7 mg gelbliches Öl als Rohprodukt (keine Ausbeuteangabe, da das Produkt Lösungsmittelreste enthält)

LC-MS: rt (%), m/z (%) = 4.066 (34.6 %), 630 (100, M+H); 4.197 (52.7), 630 (100, M+H).

Bsp. 1b: (1*R*)-1-Amino-2-phenylethyl{3-[(2*S*)-2-({[(1*S*)-1-(methoxycarbonyl)-3-methylbutyl]amino}carbonyl)tetrahydro-1*H*-pyrrol-1-yl]-2-methyl-3-oxopropyl}phosphinsäure

5



Das geschützte Aminderivat aus Bsp. 1a wird in Ethanol (ca. 0.05 mol/l) gelöst und unter Argon mit einem Katalysator (10 % Palladium auf Kohle) versetzt. Die 10 Suspension wird bei Raumtemperatur unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre (Normaldruck) ca. 2 Stunden kräftig gerührt, bevor über Celite filtriert wird (gründlich mit Ethanol nachgewaschen). Das Filtrat wird im Vakuum eingeengt und im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 80.4 mg (97.3 % der Theorie)

15 LC-MS: rt, m/z (%) = 2.706, 496 (100, M+H)

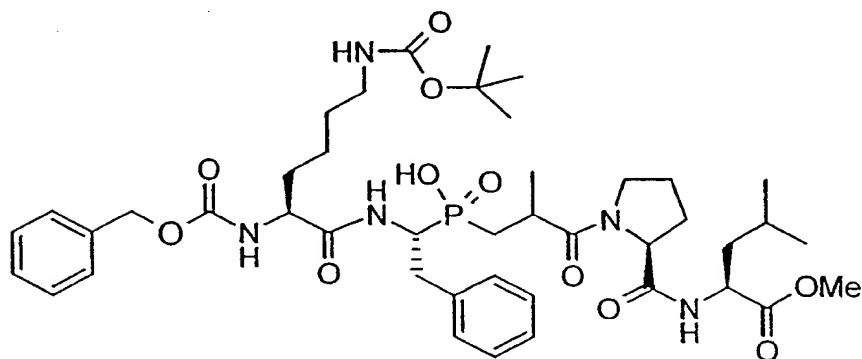
HPLC: rt (%) = 5.80 (32.5), 5.91 (51.5).

20

25

Bsp. 1c: (1*R*)-1-((2*S*)-2-[(Benzyl)carbonyl]amino)-6-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]hexanoyl]amino)-2-phenylethyl{3-[(2*S*)-2-((1*S*)-1-(methoxycarbonyl)-3-methylbutyl]amino}carbonyl)tetrahydro-1*H*-pyrrol-1-yl]-2-methyl-3-oxopropyl}phosphinsäure

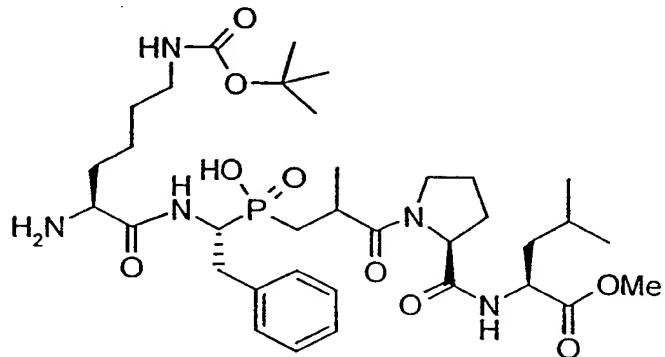
5



Zu einer Lösung von 1.0 eq. der Verbindung aus Bsp. 1b werden nacheinander unter Argon bei 0°C 4.0 eq. Ethyldiisopropylamin, 1.50 eq. PyBop und nach 2 bis 5 min  
10 1.45 eq. Z-(NH<sub>2</sub>Boc)-Lys-OH hinzugefügt. Nach 15-30 min wird die Eiskühlung entfernt und die Mischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wird mit Dichlormethan verdünnt und nacheinander mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung, 1N Salzsäure-Lösung und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt.  
15 Rohausbeute: 207 mg zähes Öl, LC-MS: rt (%), m/z (%) = 4.456 (11.2 %), 858 (100, M+H); 4.549 (32.7), 858 (100, M+H). Das Rohprodukt wird durch präparative RP-HPLC gereinigt.  
Ausbeute: 40 mg (32.8 % der Theorie).

Bsp. 1d: (1*R*)-1-({{(2*S*)-2-Amino-6-[*(tert*-butoxycarbonyl)amino]hexanoyl}amino)-2-phenylethyl{3-[(2*S*)-2-({[(1*S*)-1-(methoxycarbonyl)-3-methylbutyl]amino}carbonyl)tetrahydro-1*H*-pyrrol-1-yl]-2-methyl-3-oxopropyl}-phosphinsäure

5



Das geschützte Aminderivat aus Bsp. 1c wird in Ethanol (ca. 0.05 mol/l) gelöst und unter Argon mit einem Katalysator (10 % Palladium auf Kohle) versetzt. Die  
10 Suspension wird bei Raumtemperatur unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre (Normalsdruck) ca. 2 Stunden kräftig gerührt, bevor über Celite filtriert wird (gründlich mit Ethanol nachgewaschen). Das Filtrat wird im Vakuum eingeengt und im Hochvakuum getrocknet.

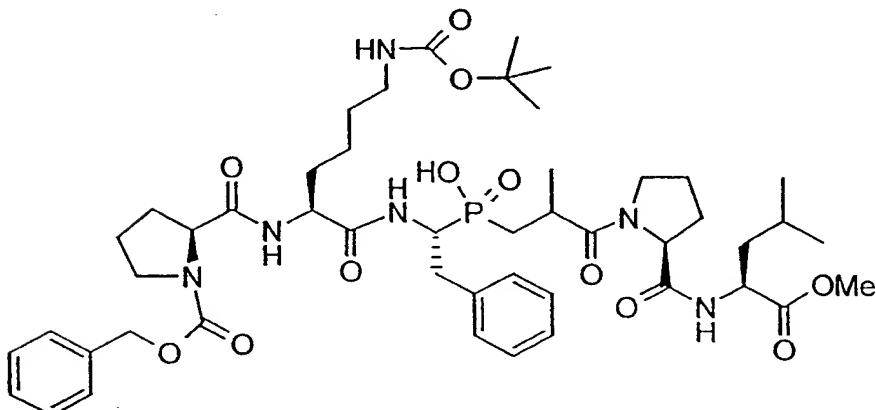
Ausbeute: 31 mg (85.4 % der Theorie)

15 LC-MS: rt (%), m/z (%) = 2.97 (85.8 %), 724 (100, M+H).

20

Bsp. 1e: (1*R*)-1-{(2*S*)-2-Amino-6-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]hexanoyl}-amino)-2-phenylethyl{3-[{(2*S*)-2-[(1*S*)-1-(methoxycarbonyl)-3-methylbutyl]amino}carbonyl]tetrahydro-1*H*-pyrrol-1-yl]-2-methyl-3-oxopropyl}phosphinsäure

5



Zu einer Lösung von 1.0 eq. der Verbindung aus Bsp. 1d werden nacheinander unter Argon bei 0°C 4.0 eq. Ethyldiisopropylamin, 1.50 eq. PyBop und nach 2 bis 5 min 10 1.45 eq. Z-Pro-OH hinzugefügt. Nach 15-30 min wird die Eiskühlung entfernt und die Mischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wird mit Dichlormethan verdünnt und nacheinander mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung, 1N Salzsäure-Lösung und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. 50 mg Rohprodukt werden erhalten.

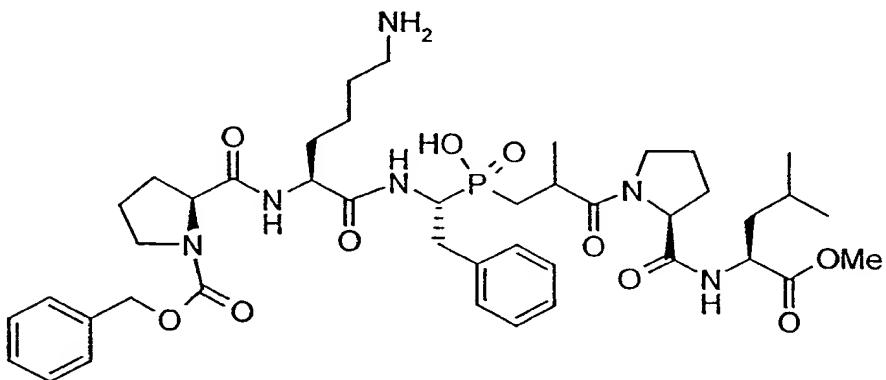
15 LC-MS: rt (%), m/z (%) = 4.394 (25.9 %), 955 (100, M+H); 4.509 (44.6), 955 (100, M+H). Das Rohprodukt wird durch präparative RP-HPLC gereinigt. Ausbeute: 24.5 mg (59.9 % der Theorie).

20

Bsp. 1f: Darstellung der Verbindung der Formel (I), R= Methyl)

(1*R*)-1-((2*S*)-6-amino-2-[(*(2S*)-1-[(benzyloxy)carbonyl]tetrahydro-1*H*-pyrrol-2-yl}carbonyl)amino]hexanoyl}amino)-2-phenylethyl{3-[(2*S*)-2-((1*S*)-1-(methoxy-carbonyl)-3-methylbutyl]amino}carbonyl)tetrahydro-1*H*-pyrrol-1-yl]-2-methyl-3-oxopropyl}phosphinsäure

5



10

Zu 24.50 mg (0.03 mmol) der Verbindung aus Bsp. 1e in einem eisgekühltem Gemisch aus 0.3 ml Methylenchlorid und 0.03 ml Wasser werden 0.3 ml Trifluoressigsäure getropft. Die Kühlung wird entfernt und es wird zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt, bevor im Vakuum eingeengt und gründlich am Hochvakuum getrocknet wird.

15

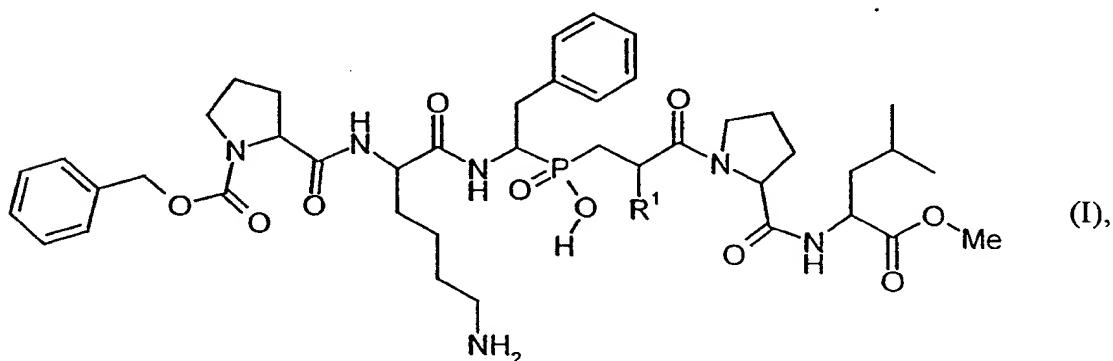
Ausbeute: 21.0 mg farbloser Feststoff (95.8 % der Theorie)

LC-MS: rt, m/z (%) = 3.057 (beide Stereoisomere), 855 (100, M+H)

RP-HPLC rt (%) = 2.18 (48.7), 2.42 (46.0).

Patentansprüche

1. Verwendung von Phosphinat-Peptidanaloga der allgemeinen Formel (I)



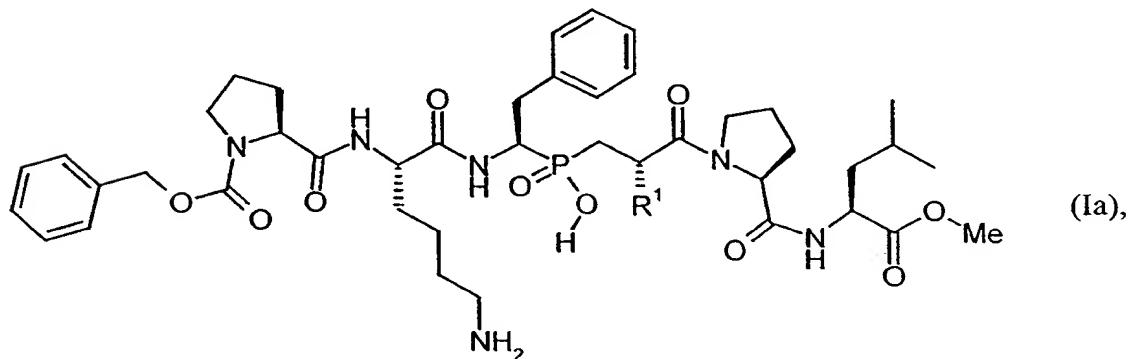
5

in welcher

R<sup>1</sup> für Wasserstoff oder Methyl steht,

10 und/oder deren Stereoisomeren und Salzen zur Herstellung von Arzneimitteln  
zur Behandlung von fibrotischen Erkrankungen.

15 2. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Verbindungen  
der allgemeinen Formel (I) mit der in der Formel (Ia) aufgezeigten Konfi-  
guration

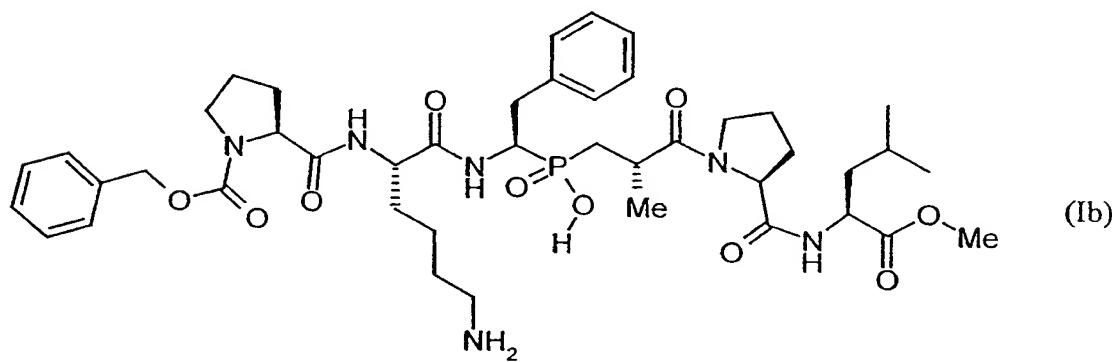


in welcher

R<sup>1</sup> für Wasserstoff oder Methyl steht,

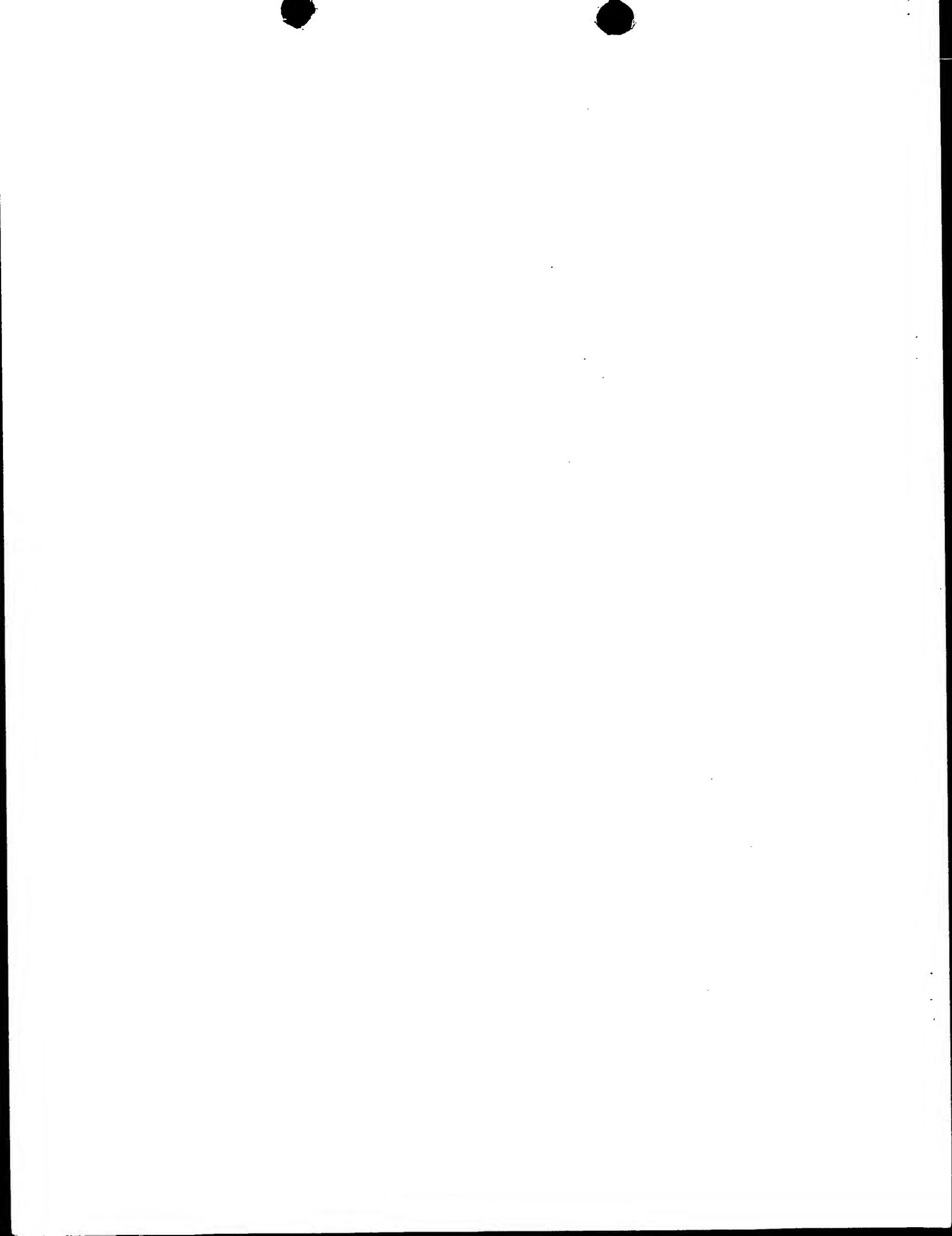
und/oder deren Stereoisomere und Salze verwendet werden.

- 5 3. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbin-  
dung der Formel (Ib)

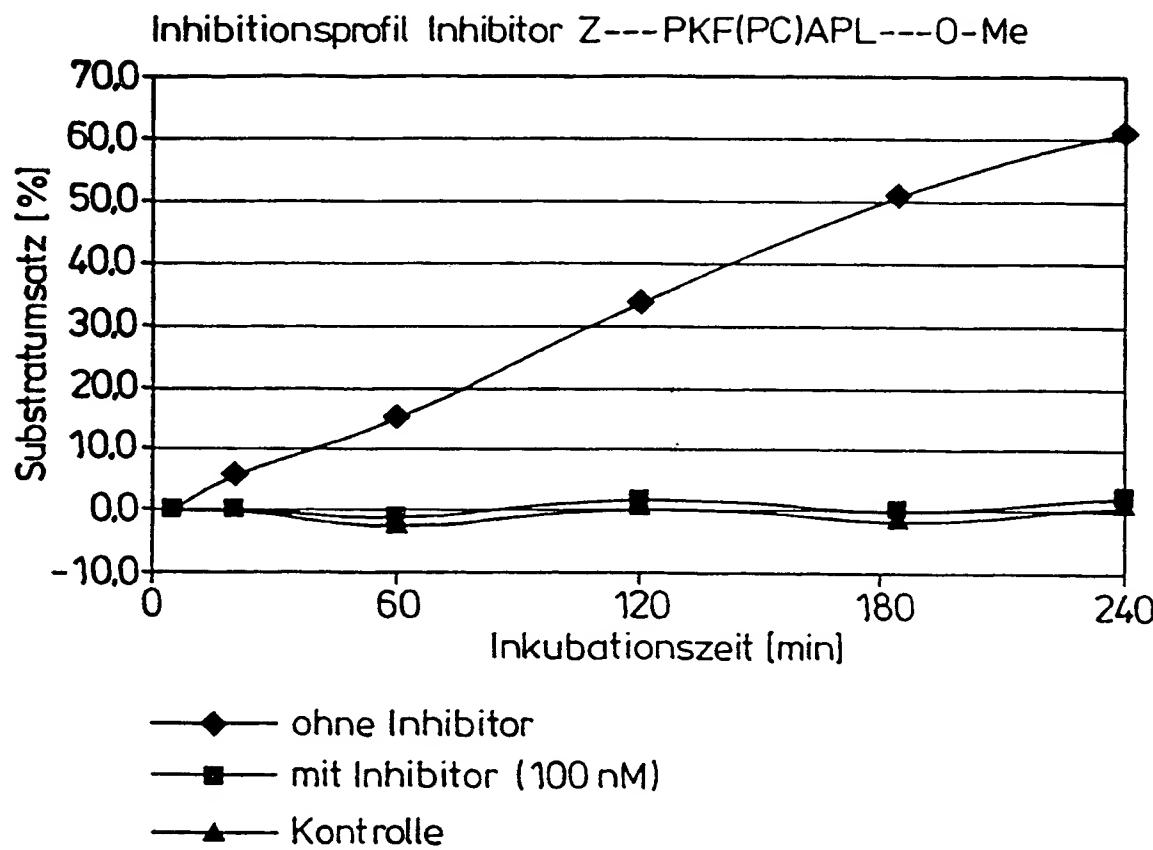
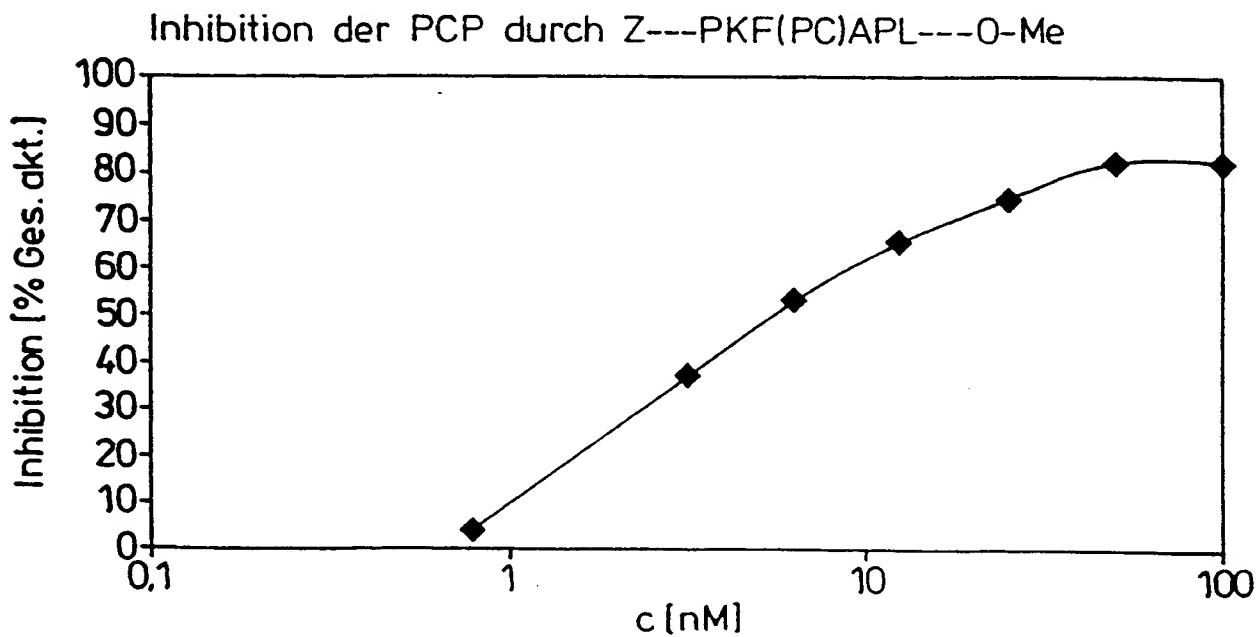


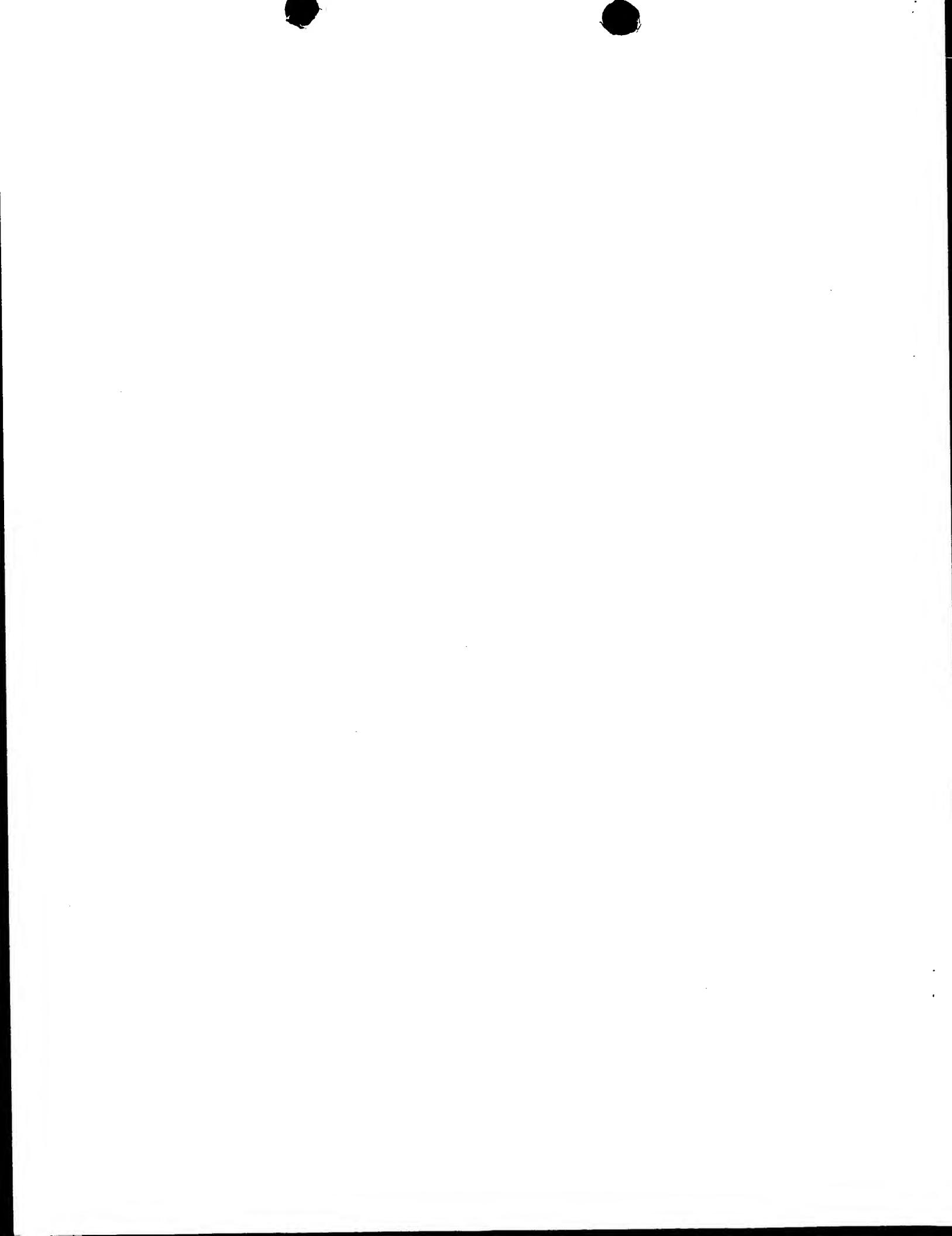
10 und/oder deren Enantiomere und Salze verwendet wird.

4. Verwendung gemäß Anspruch 1 zur Behandlung von Leberfibrose.



- 1 / 2 -

**Fig. 1****Fig. 2**



- 2 / 2 -

**Fig. 3**

Inhibitorische Wirkung des Phosphinats Z---PKF(PC)APL---O-Me auf Meprin

